



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Erythroid neoplastic cells produced functional erythroferrone to reduce hepcidin in hepatic cells (赤芽球系腫瘍細胞から産生されるエリスロフェロンは肝細胞に作用してヘプシジン産生を低下させる)
Author(s) 著 者	三浦, 翔吾
Degree number 学位記番号	甲第 3026 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2018-03-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌 第 87 巻 第 1 号 (平成 31 年 3 月) 掲載予定
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3026 号	氏 名	三浦 翔吾
<p>論文題名</p> <p>Erythroid neoplastic cells produced functional erythroferrone to reduce hepcidin in hepatic cells.</p> <p>赤芽球系腫瘍細胞から産生されるエリスロフェロンは肝細胞に作用してヘプシジン産生を低下させる.</p>			
<p>研究目的</p> <p>骨髄異形成症候群(MDS : myelodysplastic syndrome)は骨髄細胞異形と無効造血を特徴とし、血球減少と白血化をきたす疾患である. これまで我々は, MDS における組織内鉄過剰が酸化的 DNA 損傷を惹起することを報告してきた(Free Radic Biol Med 2012). 鉄過剰の原因として, 無効造血に伴う消化管からの鉄吸収の増加が関与する可能性を報告してきたが(Int J Hematol 2012), その分子機構に関しては不明である. 消化管からの鉄吸収および網内系での鉄再利用は, 二価鉄トランスポーター・フェロポーチンを介してなされている. 肝細胞から産生されるヘプシジンはフェロポーチンの発現を抑制することにより, 消化管からの鉄吸収を抑制することが明らかとされている. さらに最近になって, 肝臓でのヘプシジン産生を抑制する赤芽球由来調節因子であるエリスロフェロン(ERFE)が同定された. 赤芽球の ERFE は, エリスロポエチン(EPO)刺激に反応して発現が上昇し, それに引き続き肝細胞からのヘプシジン産生が低下し, 結果的に消化管からの鉄吸収を高めることがマウスモデルで示された. ヒトにおいては消化管出血および溶血などの急性貧血の際に, ERFE が血清で増加することが報告されている. しかしながら, MDS における ERFE 発現と消化管からの鉄吸収増加との関連は明らかにされていない.</p> <p>本研究では, 公共データベース(GEO : Gene Expression Omnibus)を用いて MDS 患者での ERFE の発現レベル, 鉄代謝への影響の解析をすると共に, 肝細胞株および赤芽球細胞株を用いて ERFE, EPO およびヘプシジンの関係性を解明することを目的とした.</p>			
<p>研究方法</p> <p>1) 赤芽球細胞の作成</p> <p>CD34 陽性臍帯血細胞を, 50 ng/ml トロンボポエチン(TPO), 10 ng/ml human stem cell</p>			

factor (SCF)および 50 ng/ml Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3LG)を添加した StemPro®-34 に 50 ng/ml に浮遊させ、あらかじめヒト間葉系幹細胞層を作成しておいた底面積 25 cm² の細胞培養フラスコで 2 週間培養した。

2 週間後にヒト間葉系幹細胞層上で増殖した未分化造血細胞を day 0 細胞として採取した。引き続き、1×10⁶/ml の day 0 細胞を、10 ng/ml SCF, 4 U/ml EPO, 10 U/ml IL-3, 20 ng/ml insulin-like growth factor (IGF)-1 および 500 µg/mL の鉄結合トランスフェリンを添加した StemPro®-34 に浮遊させ 7 日間培養した細胞を、day 7 細胞として採取した。その後、4 U/ml EPO, 20 ng/ml IGF-1 および鉄結合トランスフェリンのみを添加した培地で、さらに 7 日間培養した細胞を、day 14 細胞として保存した。赤芽球細胞への分化度はフローサイトメトリーおよび Hb 含有量によって解析した。

2) 赤芽球細胞と白血病細胞における ERFE mRNA 発現量の検討

臍帯血から分化誘導した赤芽球細胞および白血病細胞株(HL60, U937, TF-1, HEL, KG-1, K562)から TRIzol™(Invitrogen 社)を用いて Total RNA を抽出し、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行った。定量的 PCR は SYBR Green Real-Time PCR 法で行い、ERFE の検出には primer set PPH58367A を、Hepcidin の検出には primer set PPH06152A 用い、内因性コントロールは、18S rRNA(PPH05666E)を用いた。ABI PRISM®7300 Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems)を用いて解析した。

3) GEO データベースを用いた健常人(HV)および MDS 細胞における ERFE の解析

GEO に登録された GSE58831 データセットの遺伝子発現データファイル(CEL ファイル)を、ArrayExpress パッケージ(R commander version 3.4.1)を用いてダウンロードした。affy パッケージを用いて行列に変換した後、rma 法で正規化した。

GSE58831 データセットから急性骨髄性白血病 7 例、慢性骨髄単球性白血病 7 例および診断不明 15 例を除外し Data set MDS1 とした。これらのデータには SF3B1 遺伝子変異によって発症する MDS-RS-SLD(RS : Ring Sideroblasts ; SLD : Single Lineage Dysplasia, 20 例) および 5 番染色体長腕欠失によって発症する MDS with isolated del(5q)(5q-症候群, 6 例)などの特殊な MDS の病型が含まれていたため、それらを除外し data set MDS2 とした。date set MDS1 および date set MDS2 を用い、ERFE 高発現と相関がある遺伝子変異を検出すると共に、ERFE の発現と相関する遺伝子を解析した。

4) HEK293T 細胞を用いたリコンビナント ERFE の作成

HEK293T 細胞を 10 cm dish で培養した。15 µg の Myc-DKK-tagged human ERFE プラスミド(OriGene 社, RC237678)を lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS Reagent を使用して HEK293T 細胞に導入した。96 時間後に HEK293T 細胞の培養上清(CM : conditioned medium)を 0.45 µm フィルターを通した後に、ERFE CM として保存した。対照には、Mock control を HEK293T 細胞に導入し、96 時間後に得られ上清を用いた(Control CM)。

5) K562 細胞から赤芽球系細胞への分化誘導

Sodium Butylate (SB)への感受性が確認されている K562 細胞(RCB00027)に 1.0 mM SB を添加し, SB 添加前, SB 添加 2 日後および SB 添加 4 日後の細胞を採取した. メイギムザ染色, フローサイトメトリーによって赤芽球系細胞への分化度を解析した.

6) 肝細胞のヘプシジン発現に対する ERFE の効果の検討

HuH7 細胞および HepG2 細胞をそれぞれ 6well プレートで培養し, 90%コンフルエントまで培養した. その後, 培養上清を Control CM, ERFE CM あるいは K562 細胞の培養上清に置換し 6 時間作用させた. その後, RNeasy Mini Kit を使用し Total RNA を抽出した. qRT-PCR によりヘプシジンの発現量を測定した.

研究成績

1) 赤芽球系細胞の作成

臍帯血からの赤芽球への分化誘導法では, フローサイトメトリーで CD235a 陽性, CD71 陰性の成熟赤芽球系細胞が増加し, 平均赤血球ヘモグロビン量(Mean Corpuscular Hemoglobin : MCH)が増加していることから成熟赤芽球への分化が確認された.

2) 赤芽球細胞および白血病細胞における ERFE mRNA 発現量の検討

赤芽球細胞の ERFE mRNA 発現は EPO 刺激後 14 日目に約 1000 倍に増加した. 白血病細胞における ERFE mRNA の発現はごく軽度に留まった.

3) GSE58831 データセットを用いた MDS 細胞における ERFE mRNA 発現量の解析

CD34 陽性 MDS 細胞における ERFE 発現量は, CD34 陽性正常細胞と比較し, より有意に高値を示していた. data set MDS1 を用いて, 重回帰分析により ERFE mRNA 発現と関連のある遺伝子変異を解析した結果, SF3B1 変異との関連が示された($P=0.00164$). data set MDS 2 を用いて, ERFE mRNA 発現量と鉄代謝関連遺伝子との関係を解析したところ, EPO レセプター(EPO-R)遺伝子の発現と強い正の相関が検出された($P<0.00000000001$).

4) 肝細胞における ERFE の効果の検討

HEK293T 由来の ERFE CM を用いた検討で, HuH7 ではヘプシジン産生抑制効果は認められなかったが, HepG2 細胞ではヘプシジン産生抑制効果が認められた.

5) K562 細胞から赤芽球系細胞への分化

SB 刺激前は, K562 は一様の芽球様細胞の増殖を示したが, SB 刺激 2 日後には好塩基性赤芽球に分化し, 大小不同が認められた. SB 刺激 4 日後には K562 細胞は多染性赤芽球へ分化したが, 多核の異型細胞も認められた. フローサイトメトリーでは SB 刺激により CD235a 発現が上昇した. これらの結果から, K562 は SB 刺激により成熟赤芽球に分化するものの異型を伴うことが示された.

6) K562 細胞由来 CM による HepG2 細胞のヘプシジン産生抑制効果の検討

EPO 存在下で, SB 刺激 4 日後の K562 細胞由来 CM を, HepG2 細胞に作用させるこ

とによりヘプシジンの産生が有意に低下することが示された．この効果は，SB 未刺激および EPO 非存在下で培養された K562 細胞由来 CM では認められなかった．

考察

本研究により ERFE 産生は EPO 存在下で EPO-R 陽性赤芽球系細胞から産生されることが示された．ERFE は肝細胞株 HepG2 に直接作用することでヘプシジン産生を抑制することが示された．

無効造血をきたす疾患において，体内の組織鉄が増加することは，鉄同位元素，組織鉄染色，MRI を用いた検討で明らかとされてきた．この体内貯蔵鉄の増加は，鉄同位元素を用いた検討で，消化管からの鉄吸収増加に関係する可能性が報告されてきたが，その分子機能の詳細は不明であった．

最近，鉄代謝関連遺伝子が相次いでクローニングされ，さらに，無効造血をきたす血液疾患の鑑別診断法が進歩した結果，MDS の病型診断が可能となった．さらに最近，輸血非依存の MDS 患者症例の一部において肝臓への鉄沈着を示すことが報告された．本研究においても，GSE58831 の解析で，輸血非依存 MDS 患者において高フェリチン血症を呈する症例が認められた．これらの結果から MDS においては何らかの分子的機構が働いて，鉄過剰が惹起されるものと考えられた．そこで，新規に同定された赤芽球調節因子である ERFE に着目し，データベースで検討したところ，MDS 患者の CD34 陽性骨髄細胞における ERFE mRNA の発現が，健常人に比し有意に増加していることを見出した．これらの結果から，ERFE は MDS 患者に見られる鉄代謝異常に関与している可能性が示唆された．

さらに，本研究では，ERFE が高発現する要因を検討するために MDS を病型別(WHO 分類 2016)に検討した．その結果，MDS-RS-MLD (MLD : multilineage dysplasia)における ERFE 発現量は，他の病型と比較して有意に高値を示していた．さらに，GSE58831 で解析されている MDS の遺伝子変異と ERFE 発現レベルの関係を解析した結果，SF3B1 変異が ERFE mRNA の高発現と関連することが示された．また，骨髄細胞における EPO-R 発現量が，ERFE 発現量と強い相関を示していた．この結果は，ヒト骨髄由来の赤芽球における ERFE mRNA 量は，EPO に反応し増加するというこれまでの報告と一致している．これらの結果から，ERFE 高発現は，RS の存在，SF3B1 変異および EPO-R 高発現と関連性が高いと考えられた．

結論

EPO-R 陽性の赤芽球系異型細胞から産生される ERFE は，肝細胞に働いてヘプシジンの発現レベルを低下させることで，鉄代謝異常を惹起する可能性がある．

論文審査の要旨及び担当者

平成 30 年 3 月 16 日提出

(平成 30 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 3026 号	氏 名	三浦 翔吾
論文審査 担 当 者	主査 腫瘍内科学講座 加藤 淳二 教授	副査	フロンティア医学研究所 免疫制御医学部門 一宮 慎吾 教授
	副査 フロンティア医学研究 病態情報学部門 小海康夫 教授	委員	病理学第二講座 澤田 典均 教授

論文題名	Erythroid neoplastic cells produced functional erythroferrone to reduce hepcidin in hepatic cells (赤芽球系腫瘍細胞から産生されるエリスロフェロンは肝細胞に作用してヘプシジン産生を低下させる)
<p>結果の要旨</p> <p>本研究により赤芽球系異型細胞から産生されるエリスロフェロンは、エリスロポエチンに反応し産生されることが明らかとされた。エリスロフェロンは肝細胞に働いてヘプシジンの発現レベルを低下させることで、消化管からの鉄吸収を増加させることが示された。以上の成果により、学位論文として医学博士授与に値するものと、審査委員全員からご評価をいただいた。</p>	